

NP-49-NP

EP 0 911 355

AL



**PCT**  
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro  
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                         |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| (51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :<br><b>C12N 15/11, 15/89, A61K 48/00</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |  | <b>A1</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 98/21322</b>         |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | (43) Internationales<br>Veröffentlichungsdatum: 22. Mai 1998 (22.05.98) |
| (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE97/02704<br>(22) Internationales Anmeldedatum: 13. November 1997 (13.11.97)<br>(30) Prioritätsdaten:<br>196 48 625.4          13. November 1996 (13.11.96) DE<br>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): SOFT GENE GMBH [DE/DE]; Offenbacher Strasse 5, D-14197 Berlin (DE).<br>(72) Erfinder; und<br>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WITTIG, Burghardt [DE/DE]; Offenbacher Strasse 5, D-14197 Berlin (DE). JUNGHANS, Claas [DE/DE]; Guerickestrasse 1 a, D-10587 Berlin (DE).<br>(74) Anwalt: BOECKH, Tobias; Vinck & Hertin, Uhlandstrasse 173/174, D-10719 Berlin (DE).                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |  | (81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, CU, CZ, DE, EE, HU, IL, JP, KR, LT, LV, MX, NZ, PL, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).<br><br>Veröffentlicht<br><i>Mit internationalem Recherchenbericht.<br/>         Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i> |                                                                         |
| (54) Title: DESIGN PRINCIPLE FOR CONSTRUCTING EXPRESSION CONSTRUCTS FOR GENE THERAPY<br>(54) Bezeichnung: DESIGN-PRINZIP FÜR DIE KONSTRUKTION VON EXPRESSIONSKONSTRUKTEN FÜR DIE GENTHERAPIE<br>(57) Abstract<br><p>The invention concerns an expressible nucleic acid construct which contains only the sequence information necessary for expressing a gene for RNA or protein synthesis. Expression constructs of this type can be used in gene therapy and genetic vaccination and avoid many of the risks associated with constructs today. The invention further concerns the possibility of improving the conveying of the construct into cells or tissue by covalent linkage of the construct, for example to particles or peptides.</p> (57) Zusammenfassung<br><p>Die Erfindung betrifft ein expressionsfähiges Nukleinsäurekonstrukt, welches nur die zur Expression eines Gens zur RNA- oder Proteinsynthese notwendige Sequenzinformation enthält. Solche Expressionskonstrukte können in der Gentherapie und genetischen Vakzination eingesetzt werden und vermeiden viele mit den heutigen Konstrukten verbundenen Risiken. Ein anderer Aspekt der Erfindung ist die Möglichkeit, durch kovalente Verknüpfung des Konstruktes, z.B. mit Partikeln oder Peptiden, den Transport des Konstruktes in Zellen oder Gewebe zu verbessern.</p> |  |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                                                         |

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

|    |                              |    |                                   |    |                                                 |    |                                |
|----|------------------------------|----|-----------------------------------|----|-------------------------------------------------|----|--------------------------------|
| AL | Albanien                     | ES | Spanien                           | LS | Lesotho                                         | SI | Slowenien                      |
| AM | Armenien                     | FI | Finnland                          | LT | Litauen                                         | SK | Slowakei                       |
| AT | Österreich                   | FR | Frankreich                        | LU | Luxemburg                                       | SN | Senegal                        |
| AU | Australien                   | GA | Gabun                             | LV | Lettland                                        | SZ | Swasiland                      |
| AZ | Aserbaidschan                | GB | Vereinigtes Königreich            | MC | Monaco                                          | TD | Tschad                         |
| BA | Bosnien-Herzegowina          | GE | Georgien                          | MD | Republik Moldau                                 | TG | Togo                           |
| BB | Barbados                     | GH | Ghana                             | MG | Madagaskar                                      | TJ | Tadschikistan                  |
| BE | Belgien                      | GN | Guinea                            | MK | Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien | TM | Turkmenistan                   |
| BF | Burkina Faso                 | GR | Griechenland                      |    |                                                 | TR | Türkei                         |
| BG | Bulgarien                    | HU | Ungarn                            | ML | Mali                                            | TT | Trinidad und Tobago            |
| BJ | Benin                        | IE | Irland                            | MN | Mongolei                                        | UA | Ukraine                        |
| BR | Brasilien                    | IL | Israel                            | MR | Mauretanien                                     | UG | Uganda                         |
| BY | Belarus                      | IS | Island                            | MW | Malawi                                          | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| CA | Kanada                       | IT | Italien                           | MX | Mexiko                                          |    |                                |
| CF | Zentralafrikanische Republik | JP | Japan                             | NE | Niger                                           | UZ | Usbekistan                     |
| CG | Kongo                        | KE | Kenia                             | NL | Niederlande                                     | VN | Vietnam                        |
| CH | Schweiz                      | KG | Kirgisistan                       | NO | Norwegen                                        | YU | Jugoslawien                    |
| CI | Côte d'Ivoire                | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | NZ | Neuseeland                                      | ZW | Zimbabwe                       |
| CM | Kamerun                      |    |                                   | PL | Polen                                           |    |                                |
| CN | China                        | KR | Republik Korea                    | PT | Portugal                                        |    |                                |
| CU | Kuba                         | KZ | Kasachstan                        | RO | Rumänien                                        |    |                                |
| CZ | Tschechische Republik        | LC | St. Lucia                         | RU | Russische Föderation                            |    |                                |
| DE | Deutschland                  | LI | Liechtenstein                     | SD | Sudan                                           |    |                                |
| DK | Dänemark                     | LK | Sri Lanka                         | SE | Schweden                                        |    |                                |
| EE | Estland                      | LR | Liberia                           | SG | Singapur                                        |    |                                |

**Design-Prinzip für die Konstruktion von  
Expressionskonstrukten  
für die Gentherapie**

**Beschreibung**

Die Erfindung betrifft ein Design-Prinzip für ein minimales Expressionskonstrukt, welches neben Promotor- und Terminationssequenzen, die zur Steuerung der Expression notwendig sind, keine andere genetische Information enthält als die zu exprimierende. Derartige minimale Expressionskonstrukte sollen für molekularmedizinische Anwendungen eingesetzt werden, insbesondere die genetische Vakzination, Onkotherapie und -Prophylaxe.

Das Design-Prinzip soll zur Konstruktion von Expressionskonstrukten für die Expression von MHC-I oder MHC-II präsentierbaren Peptiden, Cytokinen oder Komponenten der Regulation des Zellzyklus, oder zur Synthese regulativer RNA-Moleküle wie antisense-RNA, Ribozymen oder mRNA-editierende-RNA eingesetzt werden. Wesentlicher Bestandteil der Erfindung ist es zudem, daß das Konstrukti-

- 2 -

onsprinzip die kovalente Verknüpfung des Expressionskonstrukts erlaubt, so zum Beispiel mit Peptiden, Proteinen, Kohlenhydrat- oder Glycopeptidliganden, sowie Partikeln, die zum ballistischen Transfer zum Einbringen der Konstrukte in die Zellen, insbesondere der Dermis, des Muskelgewebes, des Pankreas und der Leber benutzt werden können.

Die Erfindung soll insbesondere für zwei eng miteinander verwandte Gebiete benutzt werden: somatische Gentherapie und genetische Vakzinierung. In der Immuno-Gentherapie onkologischer Erkrankungen berühren sich diese Gebiete. Während bei der "klassischen" Gentherapie fehlende oder fehlerhafte Gene ersetzt werden sollen, soll bei der immunotherapeutischen Gentherapie das Immunsystem des Patienten gegen tumorspezifische Antigene aktiviert werden. Beim malignem Melanom und einigen anderen Tumoren konnte eine Reihe von tumorspezifischen Antigenen identifiziert werden, die durch cytotoxische T-Lymphocyten erkannt werden (Van den Eynde B. and Brichard V. G., Current Opinion in Immunology (1995) 7: 674-681). In den meisten Fällen handelt es sich um Fragmente mutierter Proteine, die entweder für die Tumorentwicklung und Promotion relevant sind (Stüber et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24: 765-768), oder um Fragmente von Proteinen aus dem veränderten Stoffwechsel der Tumorzelle. Im Fall des Melanoms entstammen die präsentierten Peptide häufig Proteinen aus der Melanocyten-spezifischen Differenzierung. Für Ansätze, die sich der Aktivierung des Immunsystems gegen solche tumorspezifischen Antigene bedienen, sind Methoden wichtig, die genannten antigenen Epitope auch in nicht-Tumorzellen wie antigenpräsentierenden Zellen (Makropha-

gen, dendritische Zellen) zu überexprimieren. Alternativ sind auch Gene, die die Expression Peptid-präsentierender Proteine steuern, wie CIITA oder ICSBP, von großer Bedeutung.

- 5 Laborexperimente und klinische Studien, in denen solche Peptide für die Induktion oder Verstärkung einer tumorspezifischen cytotoxischen Antwort eingesetzt wurden, konzentrieren sich auf konventionelle Vakzinationsprotokolle, bei denen die jeweiligen Peptide eingesetzt wurden  
10 (Strominger J., Nature Medicine, (1995) 1: 1.179 - 1.183). Alternativ wurden Antigen-präsentierende Zellen, wie dendritische Zellen, mit hohen Konzentrationen solcher Peptide inkubiert. Dadurch werden die ursprünglich durch den MHC-Komplex präsentierten Peptide gegen die tumorspezifischen Peptide ausgetauscht (Grabbe et al., Immunology Today (1995) 16:117-121).  
15

- Der Begriff der genetischen Vakzinierung (Immunisierung) beschreibt die Nutzung eines experimentellen Befundes, der zunächst als Artefakt wissenschaftlich umstritten  
20 war, seit kurzer Zeit aber für eine Vielzahl von biomedizinischen Fragestellungen bestätigt werden konnte (Piatak et al., Science 259 (1993): 1745 - 1749). Injiziert man ein Expressionsplasmid für Säugerzellen in Haut- oder Muskelschichten, so kommt es, wenn auch in sehr geringer  
25 Effizienz, in den Zellen dicht an der Injektionsstelle zur Expression des entsprechenden Gens. Handelt es sich bei dem Expressionsprodukt um ein Fremdprotein (xenogenes oder allogen Protein), kommt es, wahrscheinlich im Laufe einer lokalen Entzündung, zur Aufnahme und Präsentation  
30 von Fragmenten des exprimierten Proteins (Oligopepti-

de) durch Antigen-präsentierende Zellen (APCs). Je nach lokaler Cytokin-Situation und in Abhängigkeit davon, in welchen Zellen das Plasmid exprimiert wird (Präsentation über MHC-I oder MHC-II), kommt es zur Auslösung einer Immunreaktion auf dem  $T_{H1}$  oder  $T_{H2}$  Weg (Wang et al., Human Gene Therapy 6 (1995): 407 - 418), die letztlich jeweils zur Proliferation cytotoxischer T-Zellen oder zur Produktion löslicher Antikörper führen. Die Transfektion von dendritischen Zellen mit Expressionskonstrukten für antigene Peptide ex vivo wird in diesem Zusammenhang hier ebenfalls als genetische Vakzinierung bezeichnet.

Eine solche genetische Vakzinierung vermeidet die vielfältigen Risiken herkömmlicher Immunisierungsverfahren. Es sind zahlreiche Ansätze in der Gentherapie bekannt, durch das Einbringen von Erbinformation in Zellen therapeutische oder prophylaktische Wirkungen zu erzielen. Diese Ansätze sind nicht nur im Tierversuch, sondern auch in zahlreichen klinischen Studien an Patienten demonstriert worden, so beispielsweise das sog. ballistomagnetische Vektorsystem (EP 0 686 697 A2) für die Transfektion mit herkömmlichen, plasmidbasierten Expressionskonstrukten. Das ballistomagnetische Vektorsystem wurde durch die hiesige Anmelderin/Erfinder in drei klinischen Phase-I/II Studien für die Produktion Interleukin-7 (IL-7), Interleukin-12 (IL-12) oder Granulocyten-Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor (GM-CSF) überexprimierender Tumorzellen eingesetzt. Im Fall der Expression von IL-12 wurden separate Expressionskonstrukte für die Gene der beiden IL-12 Untereinheiten gleichzeitig ballistomagnetisch transfiziert (Schadendorf et al., Molecular Medicine Today 2 (1996): 144-145).

Mit dem Fortschreiten dieser neuen Disziplin muss allerdings der bisherige Methodenkatalog der Gentherapie kritisch untersucht werden. Ein wesentlicher Aspekt ist dabei die auf den bisher verwendeten DNA-Konstrukten enthaltene Sequenzinformation. Sollen Expressionskonstrukte an großen Patientenzahlen, und möglicherweise mehrmals, angewendet werden, so werden Sicherheitsaspekte besonders in immunologischer Hinsicht stark an Gewicht gewinnen. Die bisher angewendeten Expressionskonstrukte sind Weiterentwicklungen eukaryoter Expressionsplasmide. Diese weisen zwei fundamentale Nachteile auf: Ihre Größe, die einen schnellen Transport in den Zellkern behindert, und die Anwesenheit von für die eigentliche Anwendung nicht benötigten Sequenzen. Bisher verwendete Expressionskonstrukte tragen konstitutiv exprimierte Gene z.B. für Cytostatikaresistenzen, die als Selektionsmarker fungieren, sowie ggf. Sequenzen, die zur episomalen Replikation in der Zielzelle notwendig sind. Die Expression dieser Gene stellt einen unerwünschten Hintergrund der transfizierten genetischen Information dar. Zudem tragen diese Konstrukte neben der eigentlichen Promotor-Gen-Terminationsstruktur, die zur Expression gebracht werden soll, mindestens die zur bakteriellen Replikation notwendigen Sequenzen, da die Plasmide in Bakterien propagiert werden, die ebenfalls zur eigentlichen Anwendung nicht benötigt werden.

Es ist offensichtlich, daß die bisherigen Expressionskonstrukte nicht nur zur Expression des eigentlich gewünschten Gens führen, sondern auch zur Biosynthese xenogener Proteine, selbst wenn deren prokaryontische Promotoren sehr niedrige Aktivität in Säugerzellen aufweisen. Bei

längerer oder wiederholter Applikation kann davon ausgegangen werden, daß die erwünschte Immunantwort durch solche kontaminierenden Genprodukte maskiert wird und signifikante immunologische Komplikationen entstehen können.

- 5 Eine andere Problematik bei der Anwendung gentherapeutischer Methoden betrifft die Methode, mit der das zu transferierende genetische Material in die Zellen hineingebracht wird. Aus Gründen der Effizienz, immunologischen Sicherheit und breiten Anwendbarkeit über viele Zelltypen
- 10 ist die Methode des ballistischen Transfers bevorzugt. Ein wesentlicher Vorteil des ballistischen Transfers gegenüber den alternativen Transfektionsmethoden ist, daß die Methode relativ leicht zwischen verschiedenen Zell- oder Gewebetypen übertragbar ist. Die heute vielfach an-
- 15 gewendeten Methoden zur Transfektion von eukaryoten Zellen, wie Elektroporation oder Lipofektion, haben zudem den entscheidenden Nachteil, daß die Behandlung die zu transportierende Substanz nur über die Plasmamembran bringt, die erste Barriere, die die Zelle von ihrer Um-
- 20 welt abgrenzt. Es ist aber für die meisten in die regulatorischen Funktionen der Zelle eingreifenden Substanzen notwendig, aus dem Zytoplasma über die nukleäre Membran in den Zellkern zu gelangen. Diese Membran ist biophysikalisch grundsätzlich verschieden von der Plasmamembran, und Methoden wie Elektroporation oder Lipofektion über-
- 25 winden diese Barriere nicht. Der Grund, warum die genannten Methoden dennoch bei einem Teil der Zellen z.B. zur Expression in die Zelle eingebrachter rekombinierter Nukleinsäurekonstrukte führt, ist die Tatsache, daß beim
- 30 Vorgang der Zellteilung die nukleäre Membran offenbar durchlässig wird. Dies hat zur Konsequenz, daß mit Metho-



den wie Elektroporation oder Lipofektion nur Zellen transfiziert werden können, die sich teilen. Für viele sich langsam oder gar nicht teilende Zellarten, die im Rahmen möglicher gentherapeutischer Behandlungen interessant sind, wie Stammzellen des Immunsystems oder der Hämatopoiese, Muskelzellen, Zellen exokriner oder endokriner sekretorischer Organe, oder Neuronen und ihre Begleitzellen, kommen deshalb diese Methoden nicht in Frage. Die ebenfalls verbreitete, und in der Transfektions-effizienz sehr erfolgreiche Methode des viralen Transports von Erbmaterial hat den großen Nachteil, die transfizierten Zellen einer möglichen cytotoxischen Reaktion des Wirtsorganismus auszusetzen, was sie für gentherapeutische Ansätze nur sehr begrenzt in Frage kommen lassen dürfte.

Die Methode des ballistischen Transfers hat in der ex vivo Behandlung autologer oder allogener Patientenzellen Anwendung gefunden (Mahvi et. al.; Human Gene Therapy 7 (1996): 1535-43). Bei der Behandlung von Zellen im Zellverband allerdings, wie sie besonders für die onkotherapeutische Behandlung solider Tumore oder der massenhaften Infektionsprophylaxe durch genetische Vakzinierung vorteilhaft wäre, hat der Stand der Technik Nachteile: Die Methode des ballistischen Transfers bedient sich auf die Mikroprojekteile adsorbierter DNA. Bei Transfektion von Haut oder anderen Gewebeverbänden ist die Eindringtiefe der DNA-Konstrukte niedriger als die Eindringtiefe der Projektilen. Die DNA wird bald nach dem Auftreffen auf das Gewebe abgestreift. Es wird also nur jeweils die oberste, oder die oberen, in Richtung der Geschoßgarbe liegenden Zellschichten transfiziert, obwohl die Mikroprojekteile

z.T. viel tiefer in das Gewebe eindringen. Beim Transfizieren von solidem Tumorgewebe (Colonkarzinom, Rectumkarzinom, Nierenzellkarzinom und andere) hat man gefunden, daß bei geeigneter Einstellung der Parameter die Mikroprojektil  
5 projektil eine Eindringtiefe von bis zu fünf Zellschichten in die Gewebeschnitte erreichten. Die transfizierten Zellen aber (sichtbar als fluoreszierende Zellen bei Transfektion mit einem rekombinanten Expressionskonstrukt, das das Gen für das grün fluoreszierende Protein aus *Aequorea Victoria* enthält) lagen alle nur in der  
10 obersten, der auftreffenden Garbe an Mikroprojektilen zugewandten Zellschicht des Gewebeschnitts. Eine festere Kopplung der DNA-Konstrukte an die Oberfläche der Mikroprojektil wäre wünschenswert, um das Abstreifen der zu transportierenden Substanz zu vermeiden. Erst so wird ei-  
15 ne Anwendung gentherapeutischer Ansätze bei soliden Tumoren realistisch, da erst die Transfektion von Tumorschnitten in der Tiefe des Gewebes eine ausreichend hohe Anzahl behandelter Zellen ermöglicht. Gleichzeitig ist  
20 vorstellbar, daß eine Kombination verschiedener Kopplungsmethoden eine zeitlich verschobene Freisetzung mehrerer genetischer Informationen innerhalb der gleichen Zellpopulation ermöglicht. Für diese wie zahlreiche weitere Anwendungen wären Mikropartikel, die die zu trans-  
25 portierende Substanz bis in die getroffene Zelle bringen, wo die Substanz dann der Zelle zur Verfügung stünde, sehr wünschenswert.

Die US 5,584,807 (McCabe) beschreibt ein Instrument in Form einer gasdruckbetriebenen Pistole zum Einbringen von  
30 genetischem Material in biologisches Gewebe, wobei Goldpartikel als Trägermaterial für die genetische Informati-

- on verwendet werden, ohne aber auf das genetische Material im besonderen einzugehen. Die US 5,580,859 und US 5,589,466 (Felgner) beschreibt ein Verfahren zum Einbringen von DNA in Säugerzellen im Rahmen der Gentherapie.
- 5 Hierzu werden sogenannte nackte DNA-Sequenzen, die für physiologisch aktive Proteine, Peptide oder Polypeptide kodieren und mit einem Promotor versehen sind, direkt in Zellen injiziert. Die DNA wird in den Zellen exprimiert und dient als Vakzine.
- 10 Die WO 96/26270 (Rhone-Poulenc Rorer S.A.) beschreibt ein zirkuläres, doppelsträngiges (supercoiled) DNA Molekül, welches eine Expressionskassette enthält, kodierend für ein Gen und gesteuert über einen Promotor und einen Terminator. Auch dieses System wird in der Vakzinierung im
- 15 Rahmen der Gentherapie eingesetzt.
- Die EP 0 686 697 A2 (Soft Gene) betrifft eine Methode zur Anreicherung von Zellen, die durch ballistischen Transfer modifiziert wurden und beschreibt den technologischen Hintergrund und die damit zusammenhängende Problematik
- 20 und ihre bisher bekannten Lösungen. Primär wird hierin jedoch das grundsätzliche Verfahren des ballistischen Transfers beschrieben. Eine geeignete Vorrichtung zur Durchführung dieses Verfahrens ist in der EP 0 732 395 A1 beschrieben.
- 25 Bei den ballistischen Partikeln handelt es sich (EP 0 686 697 A2) um Goldpartikel mit einem Durchmesser von entweder 1 µm oder 1,5 µm, die in Abhängigkeit vom Zelltyp ausgewählt werden. Die Goldpartikel sind mit superparamagnetischen Partikeln von ungefähr 30 nm Durchmesser be-

schichtet. Die superparamagnetischen Partikel stellen gleichzeitig eine geeignete Oberfläche für die Beschichtung mit Biomolekülen zur Verfügung. Die Verwendung von magnetischen Partikeln dient der Sortierung.

5 Bekannt sind ferner hantelförmige Nukleinsäurekonstrukte, die sich durch folgende Merkmale auszeichnen: Es handelt sich um kurze (10-50 Basenpaare doppelsträngige DNA) Nukleinsäurekonstrukte, die zur Strukturforschung hergestellt wurden oder als doppelsträngiges, nukleasebeständigeres Oligomer zum Abfangen sequenzspezifischer DNA-  
10 Liganden (Clusel et. al.; Nucleic Acids Res. 21 (1993): 3405-11; Lim et. al., Nucleic Acids Res. 25 (1997): 575-81)

Längere DNA-Moleküle, die zum Teil während ihres Replikationszyklus auch als Hantel vorliegen können, sind aus  
15 der Natur als mitochondriale Genome einiger Arten bekannt, so bei Wimperntierchen (*ciliatae*) und Hefen (Dinul et. al., Molecular and Cell Biology, 13 (1993): 2315-23). Diese Moleküle sind etwa 50 kb groß und haben eine  
20 sehr komplexe genetische Struktur. Ebenfalls ist von *Vaccinia*-Virus eine geschlossen kovalente lineare Struktur bekannt.

Peptid-Nukleinsäureverknüpfungen mit Lokalisationssequenzen sind für kurze DNA-Oligomere bekannt. Morris et. al.  
25 (Nucleic Acids Res. 25 (1997): 2730-36) beschreiben die Kopplung von 18-meren bis 36-meren mit einem 27 Aminosäurereste enthaltenden Peptid, welches die Lokalisationssequenz aus SV40 enthält, sowie ein für die Fusion mit CD4-

positiven Zellen verantwortliches Signalpeptid aus HIV-gp41.

Der Gebrauch von Peptidketten zur Überwindung der endosomalen Membran ist von mehreren Gruppen untersucht worden.

5 So wurden die 23 N-terminalen Aminosäuren von Haemagglutinin über nicht-kovalente Wechselwirkungen an Expressionsplasmide adsorbiert, um diese Expressionsplasmide nach endosomaler Aufnahme der Komplexe in das Cytosol zu schleusen (Plank et. al., J. Biol. Chem. (1994) 269: 12918).

10 Die kovalente Verknüpfung von antisense-Desoxyoligonukleotiden mit Haemagglutinin-Peptiden wird von Bongartz et al. (Nuc. Acids Res. (1994) 22: 4681) beschrieben.

Ausgehend von diesem Stand der Technik ist es Aufgabe der

15 vorliegenden Erfindung, ein Expressionskonstrukt zu entwickeln, welches lediglich die für die Expression notwendige Information enthält und geeignete Mittel für den Transport in eine gentherapeutisch zu behandelnde Zelle zur Verfügung zu stellen.

20 Gelöst wird diese Aufgabe durch die Merkmale des Anspruchs 1 und 13. Erfindungsgemäß werden zu transportierende doppelsträngige Expressionskonstrukte aus Desoxyribonukleinsäure so modifiziert, daß die beiden antiparallelen Stränge des Desoxyribonukleinsäurepolymers, welche

25 die codierende Sequenz sowie die zu ihrer Expression notwendigen Promotor- und gegebenenfalls Terminationssequenzen enthalten, von je einer Schlaufe aus einzelsträngigen Desoxyribonukleotiden an beiden Enden derart kovalent verknüpft werden, daß ein durchgehend kovalent geschlos-

senes Molekül entsteht. Vorzugsweise ist diese Schlaufe drei bis sieben Nukleotide lang. In Figur 1 ist ein erfindungsgemäßes Konstrukt schematisch dargestellt. Derartige Expressionskonstrukte dienen zur Expression von MHC-I oder MHC-II präsentierbaren Peptiden, Cytokinen oder Komponenten der Regulation des Zellzyklus, oder zur Synthese regulativer RNA-Moleküle wie antisense-RNA, Ribozymen oder mRNA-editierende-RNA. Da die Nukleinsäure auf diese Weise kovalent geschlossen ist und keine freie OH-Enden zum Abbau zur Verfügung stellt, hat das Molekül eine sehr viel höhere Stabilität gegenüber intra- und interzellulären Nukleasen und damit eine längere Halbwertszeit im Körper bzw. der Zelle. Besonders schwer wiegt dieser Vorteil bei der Applikation *in vivo*.

Weiterhin können sich erfindungsgemäß in der genannten Schlaufe, die die Stränge miteinander verbindet, eine oder mehrere modifizierte Basen befinden, die chemische Funktionen enthalten, die die Kopplung mit einer festen Phase ermöglichen, vorzugsweise Amin-, Carbonsäure-, Thiol- oder Disulfidmodifikationen. Diese werden über bekannte Syntheseschritte mit korrespondierenden Carbonsäure-, Aldehyd-, Amin-, Thiol- oder anderen Funktionen oder direkt mit der Goldoberfläche eines Mikroprojektils zum ballistischen Transfer kovalent verbunden. Es ist vorstellbar, daß eine Kombination verschiedener Kopplungsmethoden eine zeitlich verschobene Freisetzung mehrerer genetischer Informationen innerhalb der gleichen Zellpopulation ermöglicht.

Neben dem Vorteil einer erleichterten chemischen Bindung an die Oberfläche des Mikroprojektils bietet die genannte

Nukleinsäurekonstruktion auch einen weiteren Vorteil: Die heute zumeist zur Transfektion in der Gentherapie benutzten Nukleinsäurekonstrukte werden in Bakterien produziert und tragen, neben den im Zusammenhang mit der therapeutischen Anwendung relevanten Sequenzen, auch Sequenzen, die allein für die Vermehrung des Nukleinsäurekonstrukts in den Bakterien wichtig sind. Diese Sequenzen stellen ein nicht bekanntes Risiko für den zu behandelnden Patienten dar, da nicht bekannt ist, ob und gegebenenfalls wie sie sich im Organismus auswirken können. Solche Sequenzen, die nicht ausschließlich dem primären Ziel der Transfektion in den Zielzellen dienen, lassen sich vor der Transfektion aus in Bakterien vermehrten Nukleinsäuren durch Restriktionsendonukleaseverdau entfernen und durch kovalente Bindung von kurzen, gegebenenfalls chemisch modifizierten, Endstücken aus Desoxyribonukleinsäure ersetzen. Ebenfalls können erfindungsgemäß die in die Zelle zu transportierenden Desoxyribonukleinsäuren durch Polymerase-Kettenreaktion mit chemisch modifizierten Primern hergestellt werden, so daß die Produkte der Polymerase-Kettenreaktion die zur Bindung an das Mikroprojektil benötigte chemische Modifikation enthalten. Ein Vorteil des erfindungsgemäßen Konstruktionsprinzips gegenüber herkömmlichen Expressionsvektoren ist es daher, daß das entstehende Konstrukt nur die zur Expression des Zielgens notwendige Sequenz enthält.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist, daß in der genannten Schleife aus einzelsträngigen Desoxyribonukleotiden an beiden Enden des Moleküls chemische Modifikationen so eingeführt werden können, daß sich nicht-Nukleinsäure-Liganden an das Nukleinsäure-Expressionskonstrukt kova-

lent koppeln lassen. So lassen sich etwa Peptide, die zur nukleären Lokalisation des Expressionskonstrukts führen, mit dem Konstrukt so verbinden, daß dieses auch nach Eindringen nur in das Cytosol einer Zelle von deren Translokationsapparat in nukleäre Kompartimente gebracht wird, wo das Expressionskonstrukt abgelesen werden kann. Die oben genannten Einschränkungen für manche Transfektionen wären damit aufgehoben. Ebenfalls zugänglich wäre die direkte Kopplung des Konstrukts an Peptid-, Glycopeptid- oder Kohlehydratliganden, welche das Eindringen des Konstrukts über zellspezifische Oberflächenrezeptoren ermöglichen könnten.

Insbesondere werden erfindungsgemäß zu transportierende doppelsträngige, antiparallele Expressionskonstrukte aus Desoxyribonukleinsäure so modifiziert, daß sie an den Enden der Doppelstränge je eine Disulfidbrücke enthalten, die die Stränge an beiden Enden über eine am 5'-Ende des einen und am 3'-Ende des anderen Stranges kovalent gebundene Alkylgruppe miteinander verknüpft.

Als Promotor für die Transkriptionskontrolle des Expressionsplasmids eignet sich prinzipiell jede eukaryote Promotorsequenz. Besonders vorteilhaft sind kurze Promotoren mit hoher Transkriptionsrate, welche in einer Vielzahl von Zellen transkribiert werden können, wie z.B. der "immediate early promotor" aus Cytomegalovirus (CMV-Promotor). Für die Transkription von Genen, welche für RNA kodieren, sind RNA-Polymerase III-abhängige Promotoren wie der 7SK-Promotor oder der U6-Promotor vorteilhaft. Solche Promotorsequenzen können *in vivo* die Expression kurzer antisense-RNAs, von Ribozymen und artifiziell-



ler mRNAs bewirken. RNA-Polymerase III erzeugt weitaus höhere Anzahlen an Kopien von RNA als Polymerase II und hat - was besonders vorteilhaft ist - ein exaktes Terminationssignal. Die genannten Promotorsequenzen zeichnen  
5 sich durch ihre Kürze aus, was die entsprechenden Hantel-Expressionskonstrukte klein macht, was wiederum deren Eintritt in den Zellkern bevorteilt.

Die Erfindung betrifft auch den Transport von Nukleinsäuren in Zellen. Nukleinsäuren werden in Zellen erfindungsgemäß dadurch eingebracht, daß die Nukleinsäuren an die  
10 Oberfläche des Mikroprojektils, das die Nukleinsäuren in die Zellen bringt, über Adsorption, kovalente oder ionische Wechselwirkungen so gebunden werden, daß sie beim Durchtreten des Mikroprojektils durch Bindegewebe, die  
15 Zellen umgebende Flüssigkeit oder Zellschichten nicht oder nicht vollständig desorbiert werden, sondern an die Mikroprojektile gebunden bleiben, bis sie mit diesen in den Zielzellen zur Ruhe kommen. Dies hat den Vorteil, daß die Substanz dann je nach Bindungsart entweder der Zelle  
20 in gebundenem Zustand zur Verfügung steht, oder aber in einem, im Vergleich zur Eintrittszeit in die Zelle langsameren, Prozeß desorbiert wird und in diesem desorbierten Zustand der Zelle zur Verfügung steht.

Grundsätzlich ist die Bindung von Thiolen oder Disulfiden  
25 an Goldoberflächen gut untersucht und beschrieben (G. M. Whitesides et al., Langmuir 10 (1994): 1825-1831). Die zu transportierenden Nukleinsäuren werden jedoch vorzugsweise an Mikroprojektile aus Gold gebunden, indem die Nukleinsäuren zuerst durch kovalente Modifikation mit handelsüblichen Reagenzien mit Thiol- oder Disulfidgruppen  
30

ausgestattet werden, und dann über die Thiol- oder Disulfidgruppen adsorbiert, oder durch anodische Oxidation der Thiol- oder Disulfidfunktion unter Verwendung des Gold-Mikroprojektils als Anode kovalent an das Mikroprojektil gebunden werden. Insbesondere wird erfindungsgemäß die zu transportierende Substanz durch Verknüpfung über Schwefel-Gold-Bindungen oder Disulfidbindungen an das Mikroprojektil gebunden. Bei Verwendung von Mikroprojektilen aus Gold wird die zu transportierende Substanz, wenn sie von sich aus keine Thiol- oder Disulfidgruppen, die bindungsfähig waren, enthält, durch kovalente Verknüpfung mit Thiolgruppen oder Disulfidbrücken enthaltenen Molekülen modifiziert. Sie wird dann durch Chemisorbtion an die Goldoberfläche des Mikroprojektils gebunden. Die entstehende Gold-Schwefelbindung ist stark genug, das zu transportierende Molekül auch durch mehrere Zellschichten hindurch mitzureißen.

Da in der Zelle Moleküle vorhanden sind, die Thiolgruppen aufweisen, vor allem das ubiquitäre Glutathion, kommt es in einer Gleichgewichtsreaktion der Thiolgruppen an der Goldoberfläche zu einer langsamen Desorbktion des chemisorbierten Moleküls von der Oberfläche des Mikroprojektils. Somit steht die transportierte Substanz der Zelle nach der Desorbktion frei zur Verfügung. Weiterhin kann erfindungsgemäß bei Verwendung von Mikroprojektilen aus Gold das zu transportierende Molekül, das Thiol- oder Disulfidbrücken aufweist, durch anodische Oxidation der Thiol- oder Disulfidfunktion unter Verwendung des Gold-Mikroprojektils als Anode kovalent an das Mikroprojektil gebunden werden.

Erfindungsgemäß ist auch vorgesehen, daß bei Verwendung von Mikroprojektilen aus oxidischer Keramik, Glaskeramik oder Glas das zu transportierende Molekül über Ester-, Amid-, Aldimin-, Ketal-, Acetal- oder Etherbindungen oder sonstige Funktionalitäten, die dem organischen Chemiker zur Bindung von Molekülen an feste Oberflächen bekannt sind, gebunden werden. Die zahlreichen zur Modifikation von Siliciumoxidphasen zur Verfügung stehenden Silanreagenzien bieten sich hier an.

Die Erfindung dient dem Einsatz in der ex vivo Gentherapie. Bevorzugt werden Interleukin-7 (IL-7) und Interleukin-12 (IL-12) Proteine oder deren Untereinheiten exprimiert, sowie Interleukine, Granulocyten-Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor (GM-CSF), Oberflächenantigene und Liganden immunkontrollierender oder -stimulierender Lymphozytenantigene wie CD40, B7-1 und B7-2, Proteine des MHC-Komplexes I oder II sowie beta-2 Mikroglobulin, Interferon-Konsensussequenz-bindendes Protein ICSBP, CIITA, Flt3 sowie ganze Proteine oder Fragmente dieser von präsentierbaren Epitopen aus tumorspezifisch exprimierten mutierten oder nichtmutierten Proteinen wie Ki-RAS-Fragmente, p16 und p53, oder bcr-abl Produkt. Bevorzugt ist zum einen der Einsatz von Mikropartikeln, die alle mit demselben Konstrukt markiert sind, zum anderen aber auch Cocktails (Mischungen) aus Mikroprojektilen, die mit unterschiedlichen Konstrukten verknüpft sind, das heißt mit Konstrukten, die für unterschiedliche Expressionskonstrukte kodieren, oder aber auch Cocktails aus Mikroprojektilen, die jeweils mit mehreren, ggf. unterschiedlichen Konstrukten verknüpft sind.

Das erfindungsgemäße Desoxyribonuklinsäurekonstrukt dient bevorzugt auch als Impfstoff zur Behandlung von Infektionskrankheiten an Mensch und Tier, beispielsweise Malaria und Grippe.

- 5 Weitere vorteilhafte Maßnahmen sind in den übrigen Unteransprüchen enthalten. Die Erfindung ist in den anliegenden Zeichnungen dargestellt und wird nachfolgend anhand von Beispielen näher beschrieben. Es zeigt:

10 **Figur 1** eine schematische Darstellung des Konstruktkonzeptes, worin Fig. 1.1 den Aufbau der kovalent geschlossenen Phosphat-Zuckerkette zeigt; die dargestellte Zahl an Basenpaaren entspricht nicht notwendigerweise der Länge der Konstrukte, sondern dient nur der prinzipiellen Verdeutlichung; Fig. 1.2 zeigt den funktionellen Aufbau eines von mehreren möglichen Expressionskonstrukten;

15

20

**Figur 2** zeigt den schematischen Ablauf der Konstruktdarstellung.

Beispiel 1 [Synthese der Expressionskonstrukte]:

- 25 Das grundlegende Konstruktionsprinzip wird in Fig. 2 schematisch wiedergegeben und sieht wie folgt aus:

### 1.1 Synthese aus Vektor:

Das zu exprimierende Gen, z.B. Granulozyten-Makrophagen-stimulierender Faktor gm-csf, wird aus cDNA mittels geeigneter Primer mittels PCR amplifiziert (Fig. 2 (1)) und  
5 in einen geeigneten Plasmidvektor rekombiniert (Fig. 2 (2)). Nach Sequenzierung und Bestätigung der Zielsequenz wird die zu exprimierende Sequenz aus dem genannten Plasmidvektor mittels zweier Primer (Oligodesoxynukleotide, welche an der 5'-Seite ihrer Sequenz Erkennungsstellen  
10 für Restriktionsendonucleasen tragen) amplifiziert (Fig. 2 (3)). Das entstehende Amplifikationsprodukt wird mit den genannten Endonukleasen, für welche eine Erkennungssequenz auf den genannten Primern vorhanden war, verdaut. Nach Isolierung des amplifizierten Fragments aus Agarose-  
15 gel wird dieses in ein Expressionsplasmid rekombiniert, welches in Bakterien vermehrbar ist, und in welchem das zu exprimierende Gen in der gewünschten Orientierung im Kontext der auf dem Expressionsplasmid befindlichen expressionssteuernden Sequenzen angeordnet ist (Fig. 2  
20 (4)).

Besagtes Expressionsplasmid wird in Bakterien vermehrt und nach bekannten Methoden isoliert. Nach Verdau mit Restriktionsendonukleasen, deren Erkennungssequenzen die Sequenz flankieren, welche das hantelförmige Expressions-  
25 konstrukt tragen soll, werden die Restriktionsfragmente durch geeignete Methoden mit Anionen-Austauschchromatographie getrennt voneinander isoliert (Fig. 2 (5)) und anschliessend mit haarnadelförmig selbsthybridisierenden Oligodesoxynukleotiden (kurze,  
30 durch automatisierte chemische DNA-Synthese hergestellte

DNA-Moleküle, die aufgrund ihrer Selbstkomplementarität Stamm-Schlaufenstrukturen bilden können; diese Moleküle formen später die kovalent geschlossenen Enden der hantelförmigen DNA-Moleküle) welche einen auf den durch Restriktionsverdau entstandenen Überhang des Konstruktes passenden Überhang ihrer Doppelstrangstruktur aufweisen, ligiert (Fig. 2 (6)). Nach Abtrennen der überschüssigen Haarnadel-Desoxyoligonukleotide mittels Anionen-Austauschchromatographie liegen die die Erfindung ausmachenden Konstrukte vor.

#### 1.2 Synthese aus PCR-Produkt

Alternativ wird das Konstrukt direkt mittels Polymerase-Kettenreaktion vermehrt, wobei die Primeroligodesoxynukleotide an der 5'-Seite ihrer Sequenz Erkennungsstellen für Restriktionsendonucleasen tragen (Fig. 2 (7)). Nach ionentausch-chromatographischem Abtrennen der Primer wird das entstandene Amplifikationsprodukt mit den Endonukleasen, für welche eine Erkennungssequenz auf den genannten Primern vorhanden war, verdaut. Nach erneutem Abtrennen der kleineren Restriktionsfragmente wird das Konstrukt mit kurzen, haarnadelförmig selbsthybridisierenden Oligodesoxynukleotiden, welche einen auf den durch Restriktionsverdau entstandenen Überhang des Konstruktes passenden Überhang ihrer Doppelstrangstruktur aufweisen, ligiert (Fig. 2 (8)). Nach Abtrennen der überschüssigen Haarnadel-desoxyoligonukleotide mittels Anionen-Austauschchromatographie liegen die die Erfindung ausmachenden Konstrukte vor.

- 21 -

Ein Expressionskonstrukt, welches aus der Sequenz für gm-csf unter Kontrolle des "early immediate promotor" aus CMV und der Polyadenylierungssequenz aus SV40 besteht, wurde aus dem Plasmid mtv-gmcsf durch vollständigen Verdau mit EcoRI und Hind III ausgeschnitten. Das kleinere  
5 Fragment (1290 bp) wurde mit Anionenaustauschchromatographie (stat.Phase: Merck Fractogel EMD-DMAE; 25 mM Tris/HCl pH 8; 0-1M NaCl) isoliert und nach Konzentration und Entsalzung mit einem 200-fachen molaren Überschuss an  
10 5'-phosphorylierten Haarnadel-Desoxyoligoribonukleotiden AATTCGGCCGGCCGTTTTTCGGCCGGCCG und AGCTTGGCCGGCCGTTTTTCGGCCGGCCA (TIB-Molbiol, Berlin) in Anwesenheit von 25 u/ml T4-DNA-Ligase über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen  
15 auf 60°C gestoppt. Das mit dem Desoxyoligoribonukleotid ligierte Konstrukt wurde durch Anionenaustauschchromatographie von dem überschüssigen Desoxyoligoribonukleotid abgetrennt, durch Ethanol-fällung konzentriert, in Wasser aufgenommen und nach bekannten Verfahren im ballistischen  
20 Transfer auf sterile primäre Colonicarcinom-Zellen angewendet.

Beispiel 2 [in vivo Expression]:

Ballistischer Transfer von gm-csf auf K562:

30 µl einer Suspension von Goldpartikeln (1.6 µm Durchmesser, bezogen von Bio-Rad, Hercules, CA, USA, Konzentration der Suspension: 30 mg/ml) werden auf eine Makrocarrier-Polymerplatte (Fa. Bio-Rad) aufpipettiert. Man wartet, bis sich das Gold abgesetzt hat, und zieht den Überstand vorsichtig ab. Auf die benetzte Fläche wird 30  
25

- 22 -

5  $\mu$ l einer 1+3 Mischung aus einer Suspension kolloidaler  
Magnetpartikel (mittlerer Durchmesser: 65 nm; Miltenyi  
GmbH, Bergisch-Gladbach, Deutschland; eingesetzt, wie vom  
Hersteller geliefert; Konz. unbekannt) und gmcfsf-  
10 Expressions-Hantelkonstrukt (siehe Bsp. 1) pipettiert.  
Man wirbelt das abgesetzte Gold auf und läßt das Gemisch  
sich absetzen. Man zieht die überstehende Flüssigkeit ab  
und läßt die Goldpartikel antrocknen. Auf eine Petrischa-  
le (3,5 cm) werden 300  $\mu$ l Polylysin in der Mitte aufbe-  
15 bracht, 30 min stehen gelassen und mit PBS-Medium abge-  
spült. Zwischen 100.000 und 200.000 Zellen (Erythroleukä-  
miezelllinie K 562) werden in 300  $\mu$ l RPMI-Medium (10% FKS)  
auf die polylysinbeschichtete Fläche der Petrischale ge-  
bracht und 10 min stehen gelassen. Man überschichtet mit  
15 2 ml RPMI-Medium (10% FKS) und läßt 1-2 h im Brutschrank  
inkubieren.

Der ballistische Transfer wird an einer Biolistic PDS  
1000/He (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) nach Vorschrift des  
Herstellers des Apparats durchgeführt. Die verwendete  
20 Berstscheibe entspricht einem Sollbruchdruck von 1.100  
psi. Der Druck der Vakuumzelle beträgt 508 mm Quecksil-  
bersäule (20 inches Hg). Magnetische Separation erfolgt  
wie veröffentlicht (EP 0 732 395 A1); Erfolgskontrolle  
erfolgt durch gm-csf-ELISA.

25 Beispiel 3 [Beispiel für Herstellung eines Expressions-  
konstruktes mit nukleärer Lokalisationssequenz]:

Ein Expressionskonstrukt, welches aus der Sequenz für das  
grün fluoreszierende Protein EGFP (Clonotech) unter Kon-  
trolle des "early immediate promotor" aus CMV und der Po-



- 23 -

lyadenylierungssequenz aus SV40 besteht, wurde aus dem Plasmid mtv-egfp durch vollständigen Verdau mit EcoRI und HindIII ausgeschnitten. Das kleinere Fragment (1601 bp) wurde mit Anionenaustauschchromatographie (stat.Phase: Merck Fractogel EMD-DMAE; 25 mM Tris/HCl pH 8; 0-1M NaCl) isoliert und nach Konzentration und Entsalzung mit einem 200-fachen molaren Überschuss an 5'-phosphorylierten Haarnadel-Desoxyoligoribonukleotiden

5 AATTCGGCCGGCCGTXTCGGCCGGCCG und

10 AGCTTGGCCGGCCGTXTCGGCCGGCCA in Anwesenheit von 25 u/ml T4-DNA-Ligase über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. (X bezeichnet die Peptidmodifikation: Amino-Uracil mit über X-Kopplung verbundenem Peptid (TIB-Molbiol, Berlin)). Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 60°C gestoppt. Das mit

15 dem thiolmodifizierten Desoxyoligoribonukleotid ligierte Konstrukt wurde durch Anionenaustauschchromatographie von dem überschüssigen Desoxyoligoribonukleotid abgetrennt, durch Ethanolfällung konzentriert und in Wasser aufgenommen. 1 µg des thiolmodifizierten Konstruktes wurde mit 1

20 mg Mikroprojektilen (Gold sphärisch, mittlerer Durchmesser 1 µm, Bio-Rad, Hercules, CA) in Wasser über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Goldpartikel wurden zwei Mal mit Wasser gewaschen und nach bekannten Verfahren im ballistischen Transfer auf festwachsende Keratinozyten

25 angewendet.

Beispiel 4 [Synthese der Nukleinsäure-modifizierten Gold-Partikel]:

Ein Expressionskonstrukt, welches aus der Sequenz für gm-csf unter Kontrolle des "early immediate promotor" aus

30 CMV und der Polyadenylierungssequenz aus SV40 besteht,

- 24 -

wurde aus dem Plasmid mtv-gmcsf durch vollständigen Verdau mit EcoRI und HindIII ausgeschnitten. Das kleinere Fragment (1290 bp) wurde mit Anionenaustauschchromatographie (stat. Phase: Merck Fractogel EMD-DMAE; 25 mM Tris/HCl pH 8; 0-1M NaCl) isoliert und nach Konzentration und Entsalzung mit einem 200-fachen molaren Überschuss an 5'-phosphorylierten Haarnadel-Desoxyoligoribonukleotiden AATTCGGCCGGCCGTXTCGGCCGGCCG und AGCTTGGCCGGCCGTXTCGGCCGGCCA (X bezeichnet den Thiol-Modifier C6 S-S (TIB-Molbiol, Berlin)) in Anwesenheit von 25 u/ml T4-DNA-Ligase über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 60°C gestoppt. Das mit dem thiolmodifizierten Desoxyoligoribonukleotid ligierte Konstrukt wurde durch Anionenaustauschchromatographie von dem überschüssigen thiolmodifizierten Desoxyoligoribonukleotid abgetrennt, in Wasser aufgenommen 1 µg des thiolmodifizierten Konstruktes wurde mit 1 mg Mikroprojektilen (Gold sphärisch, mittlerer Durchmesser 1 µm, Bio-Rad, Hercules, CA) in Wasser über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Goldpartikel wurden zwei Mal mit Wasser gewaschen und im ballistischen Transfer auf sterile primäre Colonicarcinom-Zellen angewendet (siehe Bsp. 5).

Beispiel 5 [Ballistischer Transfer auf solides Tumorgewebe]:

Steriles primäres Colonicarcinomgewebe wurde chirurgisch entnommen und auf Eis gekühlt. Nekrotische und Bindegewebesteile werden, soweit möglich, entfernt. Stücke von etwa 1 cm<sup>2</sup> Oberfläche werden herausgeschnitten, in eiskaltem PBS gewaschen und auf dem Probenhalter eines Gewe-

- 25 -

beschneiders (vibratome 1000 sectioning system; TPI, St. Louis, Missouri) mit Gewebeklebstoff fixiert. Der Tumor wird in 500 µm dicke Scheiben zerschnitten. Die Scheiben werden in eiskaltem PBS gelagert und werden so schnell wie möglich transfiziert. 30 µl einer Suspension von gm-csf-Expressionskonstrukt-beschichteten Goldpartikeln und kolloidaler Magnetpartikel (mittlerer Durchmesser: 65 nm; Miltenyi GmbH, Bergisch-Gladbach) werden auf eine Makro-carrier-Polymerplatte (Fa. Bio-Rad) aufpipettiert. Man wartet, bis sich das Gold abgesetzt hat, zieht den Überstand vorsichtig ab und läßt die Goldpartikel antrocknen. Der Vorgang des ballistischen Transfers ist mit dem in Beispiel 2 beschriebenen Vorgehen identisch. Es werden beide Seiten der Scheibe beschossen. Nach der Transfektion wird die Scheibe zwei Mal durch ein Zellsieb passiert, und die Zellen werden separiert wie beschrieben.

Magnetische Separation erfolgt wie veröffentlicht (EP 0 732 395 A1); Erfolgskontrolle erfolgt durch gm-csf-ELISA.

20 Beispiel 6 [Synthese der Nukleinsäure-modifizierten Aluminium-Partikel]:

5 µg des Expressionskonstruktes, welches aus der Sequenz für das grün fluoreszierende Protein EGFP (Clontech) unter Kontrolle des "early immediate promotor" aus CMV und der Polyadenylierungssequenz aus SV40 besteht, wurde aus dem Plasmid mtv-egfp durch vollständigen Verdau mit EcoRI und HindIII ausgeschnitten. Das kleinere Fragment (1601 bp) wurde mit Anionenaustauschchromatographie (stat.Phase: Merck Fractogel EMD-DMAE; 25 mM Tris/HCl pH 8; 0-1M NaCl) isoliert und nach Konzentration und Entsalzung mit einem 200-fachen molaren Überschuss an 5'-

- 26 -

phosphorylierten Haarnadel-Desoxyoligoribonukleotiden  
AATTCGGCCGGCCGTYTCGGCCGGCCG und  
AGCTTGGCCGGCCGTYTCGGCCGGCCA (Y bezeichnet das Carbonsäure-modifizierte Thymidindesoxynukleotid (TIB Molbiol, Berlin) in Anwesenheit von 25 u/ml T4-DNA-Ligase über  
5 Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

1 g Aluminiumoxidpartikel (mittlerer Durchmesser 1,0 µm) wurden in einer Lösung von Triethoxyaminopropylsilan in Toluol (2%) über Nacht am Rückfluß gekocht. Der Feststoff  
10 wird abfiltriert, mit Toluol, anschließend Ethanol gewaschen, getrocknet und erneut gemahlen. 5 mg des erzeugten aminomodifizierten Aluminiumoxids werden in 100 ml wäßrigem Carbonatpuffer (pH 8,0) mit 4 µg des Carbonsäure-modifizierten Konstruktes in Anwesenheit von 50 mM 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)carbodiimid und 50 mM N-Hydroxysuccinimid 2 h bei Raumtemperatur umgesetzt. Die  
15 erzeugten nukleinsäuregekoppelten Mikropartikel können durch Beschleunigung auf Zellen in einer geeigneten Apparatur, wie z.B. in der DE 195 10 696 und EP 0 732 395 A1 beschrieben, zum Eindringen in die Zellen gebracht werden, wodurch die auf dem transportierten Plasmid enthaltene Information der Zelle zugänglich gemacht wird.  
20

**Patentansprüche**

1. Desoxyribonukleinsäurekonstrukt zur Transkription von RNA-Molekülen, gekennzeichnet durch einen zirkulären Strang Desoxyribonukleinsäure mit einer teilweise zu-  
einander komplementären, antiparallelen Basensequenz,  
5 so daß ein hantelförmiges Konstrukt entsteht,  
  
- wobei der zueinander komplementäre, antiparallele Basenabschnitt im wesentlichen aus einem Promotor, einem kodierenden Bereich und entweder einem Poly(A)-Additionssignal oder einer anderen RNA-stabilisierenden Sequenz besteht,  
10  
  
- und der nicht komplementäre Basenabschnitt zwei Schleifen einzelsträngiger Desoxyribonukleinsäure bildet, die jeweils das 5'- und 3'-Ende des komplementären, antiparallelen Basenabschnitts kovalent  
15 miteinander verbinden.
2. Desoxyribonukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Schleifen aus drei bis sieben Nukleotiden gebildet werden, von denen eines oder mehrere durch eine oder mehrere alkylische Carbonsäure-, Amin-, Thiol- oder Aldehydfunktionen chemisch modifiziert sind.  
20
3. Desoxyribonukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß mit den chemisch modifizierten Nukleotiden ein Peptid kovalent verknüpft

ist, welches zum gerichteten Transport des Konstrukts in den Zellkern führt.

4. Desoxyribonukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß mit den chemisch modifizierten Nukleotiden ein Peptid kovalent verknüpft ist, welches das Verlassen des Konstruktes aus dem Endosom in das Cytosol ermöglicht.
5. Desoxyribonukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein 7-SK RNA-Promotor verwendet wird.
10. Desoxyribonukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein CMV-Promotor verwendet wird.
15. Desoxyribonukleinsäurekonstrukt nach wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 6, kodierend für Interleukin-7.
8. Desoxyribonukleinsäurekonstrukt nach wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 6, kodierend für Interleukin-12 oder eine oder mehrere Interleukin-12-Untereinheiten.
20. Desoxyribonukleinsäurekonstrukt nach wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 6, kodierend für GM-CSF.
10. Desoxyribonukleinsäurekonstrukt nach wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 6, kodierend für p16 oder p53 Protein oder deren Fragmente.
25. Desoxyribonukleinsäurekonstrukt nach wenigstens einem der Ansprüche 1 bis 6, kodierend für Aminosäuren-

Fragmente aus mutierten Ki-RAS, mutiertem p53 oder bcr-abl Translokationsprodukt mit einer Sequenzlänge von 10-100 Aminosäuren.

- 5 12. Mikroprojektil zum ballistischen Transfer von Desoxy-  
ribonukleinsäurekonstrukten in Zellen gemäß einem  
oder mehreren der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekenn-  
zeichnet, daß die zu transportierende Substanz durch  
Adsorptionswechselwirkungen oder kovalente oder ioni-  
sche Bindungen derart an das Mikroprojektil gebunden  
10 wird, daß die zu transportierende Substanz beim  
Durchtreten des Mikroprojektils durch Bindegewebe,  
die Zellen umgebende Flüssigkeit oder Zellschichten  
nicht oder nicht vollständig desorbiert wird, sondern  
an das Mikroprojektil gebunden bleibt, bis die zu  
15 transportierende Substanz mit dem Mikroprojektil in  
der Zielzelle zur Ruhe kommt.
- 20 13. Mikroprojektil nach Anspruch 12, dadurch gekennzeich-  
net, daß das Mikroprojektil aus einem der Materialien  
Gold, mikrokristallines Oberflächengold, Oxidkeramik,  
Glaskeramik oder Glas besteht und die zu transportie-  
rende Nukleinsäure über Thiol- oder Disulfidfunktion,  
Ester-, Amid-, Aldimin-, Ketal-, Acetal-, oder Ether-  
bindungen kovalent mit dem Mikroprojektil verknüpft  
ist.
- 25 14. Mikroprojektil nach Anspruch 12 oder 13, dadurch ge-  
kennzeichnet, daß besagtes Mikroprojektil aus einem  
elektrisch leitfähigen Material besteht und die Nu-  
kleinsäure durch elektrochemische Reaktion einer mit  
der Nukleinsäure durch kovalente Bindung verbundenen

Thiol- oder Disulfidfunktion unter Verwendung des Mikroprojektils als Elektrode kovalent an das Mikroprojektil gebunden wird.

- 5      15. Mikroprojektil nach Anspruch 12 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß das Mikroprojektil eine Korngröße von 0,3 bis 3,0  $\mu\text{m}$  aufweist.
16. Verwendung der Desoxyribonukleinsäurekonstrukte gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 11 in der *ex vivo* Gentherapie.
- 10      17. Verwendung der Mikroprojektile gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 12 bis 15 in der *ex vivo* Gentherapie.
- 15      18. Verwendung der Desoxyribonukleinsäurekonstrukte gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6 als Impfstoff zur Behandlung von Infektionskrankheiten an Mensch und Tier.





1

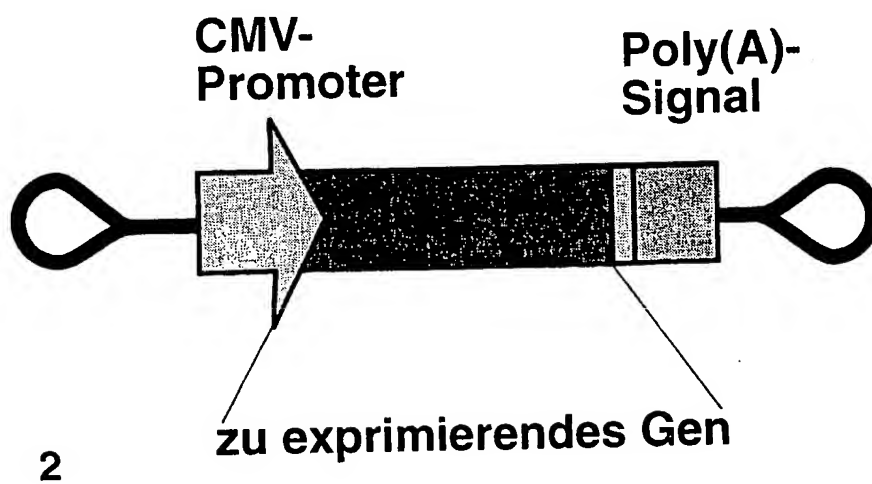


Fig. 1

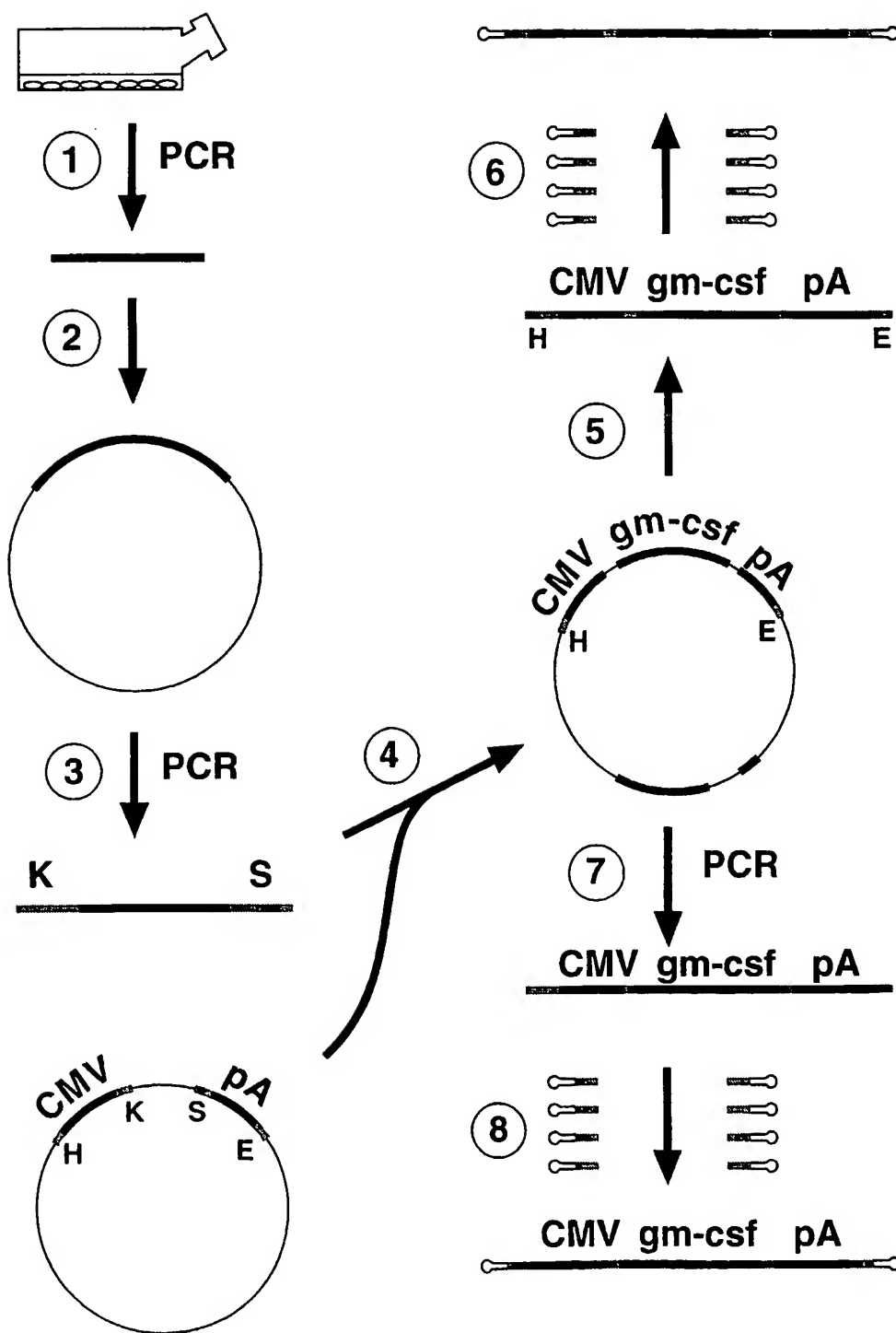


Fig. 2

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 97/02704

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/11 C12N15/89 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X          | WO 96 32473 A (GENSET ;BLUMENFELD MARTA (FR)) 17 October 1996                      | 1,5-11,               |
| Y          | see the whole document                                                             | 16,18                 |
|            | ---                                                                                | 12-15,17              |
| Y          | EP 0 686 697 A (SOFT GENE GMBH) 13 December 1995                                   | 12-15,17              |
|            | cited in the application                                                           |                       |
|            | see the whole document                                                             |                       |
|            | -----                                                                              |                       |

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 April 1998

Date of mailing of the international search report

30. 04. 98

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hillenbrand, G

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 97/02704

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO 9632473 A                              | 17-10-96            | FR 2732971 A               | 18-10-96            |
|                                           |                     | EP 0820508 A               | 28-01-98            |
| -----                                     |                     |                            |                     |
| EP 0686697 A                              | 13-12-95            | DE 4416784 A               | 30-11-95            |
| -----                                     |                     |                            |                     |

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 97/02704

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/11 C12N15/89 A61K48/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehorende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| X          | WO 96 32473 A (GENSET ;BLUMENFELD MARTA (FR)) 17.Oktober 1996                                      | 1,5-11, 16,18      |
| Y          | siehe das ganze Dokument                                                                           | 12-15,17           |
|            | ---                                                                                                |                    |
| Y          | EP 0 686 697 A (SOFT GENE GMBH) 13.Dezember 1995                                                   | 12-15,17           |
|            | in der Anmeldung erwähnt                                                                           |                    |
|            | siehe das ganze Dokument                                                                           |                    |
|            | -----                                                                                              |                    |

☐ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

### \* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

15.April 1998

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

30.04.98

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, T.x. 31 651 epo.nl.  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hillenbrand, G

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 97/02704

| Im Recherchenbericht<br>angeführtes Patentdokument | Datum der<br>Veröffentlichung | Mitglied(er) der<br>Patentfamilie | Datum der<br>Veröffentlichung |
|----------------------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| WO 9632473 A                                       | 17-10-96                      | FR 2732971 A                      | 18-10-96                      |
|                                                    |                               | EP 0820508 A                      | 28-01-98                      |
| EP 0686697 A                                       | 13-12-95                      | DE 4416784 A                      | 30-11-95                      |